



Bihun jagung



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Mangala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	1
6 Pengambilan contoh	2
7 Cara uji	2
8 Syarat lulus uji	3
9 Higiene.....	3
10 Pengemasan.....	3
11 Syarat penandaan	3
Lampiran A (normatif) Cara uji bihun jagung	4
Bibliografi	31

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Bihun jagung* ini merupakan SNI baru. Standar ini disusun dengan tujuan sebagai berikut:

- Melindungi konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Mendukung perkembangan dan diversifikasi produk industri bihun jagung dan industri pengguna bihun jagung.

Dalam merumuskan SNI ini tim telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-Undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-Undang Republik Indonesia No. 23 Tahun 1992 tentang Kesehatan.
3. Undang-Undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
4. Undang-Undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
5. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No.HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori Pangan.
8. Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No.03725/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Logam Berat dalam Makanan atau revisinya.
9. Keputusan Direktur Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan No. 03726/B/SK/VII/89 tentang Batas Maksimum Cemaran Mikroba dalam Makanan atau revisinya.

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman Departemen Perindustrian, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 19 Nopember 2009 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil dari konsumen, produsen, lembaga pengujian, lembaga ilmu pengetahuan dan teknologi, Badan Pengawas Obat dan Makanan, dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 22 Maret 2010 sampai dengan tanggal 22 Juni 2010 dengan hasil akhir RASNI.

Bihun jagung

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji bihun jagung.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*

3 Istilah dan definisi

3.1

bihun jagung

produk makanan kering yang dibuat dari pati jagung dengan atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan, berbentuk benang-benang khas bihun

4 Komposisi

4.1 **Bahan baku**

pati jagung tidak kurang dari 90%

4.2 **Bahan pangan lain**

bahan pangan lain yang sesuai untuk bihun jagung

4.3 **Bahan tambahan pangan**

bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk bihun jagung sesuai dengan ketentuan yang berlaku

5 Syarat mutu

Syarat mutu bihun jagung sesuai Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1 – Syarat mutu bihun jagung

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
1	Keadaan		
1.1	Bau	-	normal
1.2	Warna	-	putih hingga putih kekuningan
1.3	Rasa	-	normal
2	Benda asing	-	tidak ada
3	Keutuhan (b/b)	%	min. 90

Tabel 1 (lanjutan)

No	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan
4	Kadar air (b/b)	%	maks. 12
5	Abu (b/b)	%	maks. 0,4
6	Cemaran logam		
6.1	Kadmium (Cd)	mg/kg	maks. 0,1
6.2	Timbal (Pb)	mg/kg	maks. 0,3
6.3	Timah (Sn)	mg/kg	Maks. 40
6.4	Merkuri (Hg)	mg/kg	maks. 0,05
7	Cemaran arsen (As)	mg/kg	maks. 0,5
8	Cemaran mikroba		
8.1	Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)	koloni/g	maks. 1×10^6
8.2	<i>Escherichia coli</i>	APM/g	maks. 10
8.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks. 1×10^3
8.4	<i>Bacillus cereus</i>	koloni/g	maks. 1×10^3
8.5	Kapang	koloni/g	maks. 1×10^4

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428, Petunjuk pengambilan contoh padatan.

7 Cara uji

Cara uji untuk bihun jagung seperti di bawah ini:

- Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
 - Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
 - Cara uji warna sesuai Lampiran A.2.2
 - Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.3
- Cara uji benda asing sesuai Lampiran A.3
- Cara uji keutuhan sesuai Lampiran A.4
- Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.5
- Cara uji abu sesuai Lampiran A.6
- Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.7
 - Cara uji kadmium (Cd) dan timbal (Pb) sesuai Lampiran A.7.1
 - Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.7.2
 - Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.7.3
- Cara uji cemaran arsen (As) sesuai Lampiran A.8
- Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.9
 - Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.9.1
 - Cara uji angka lempeng total (35 °C, 48 jam) sesuai Lampiran A.9.2
 - Cara uji *Escherichia coli* sesuai Lampiran A.9.3
 - Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.9.4

- Cara uji *Bacillus cereus* sesuai Lampiran A.9.5
- Cara uji kapang sesuai Lampiran A.9.6

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai pasal 5.

9 Higiene

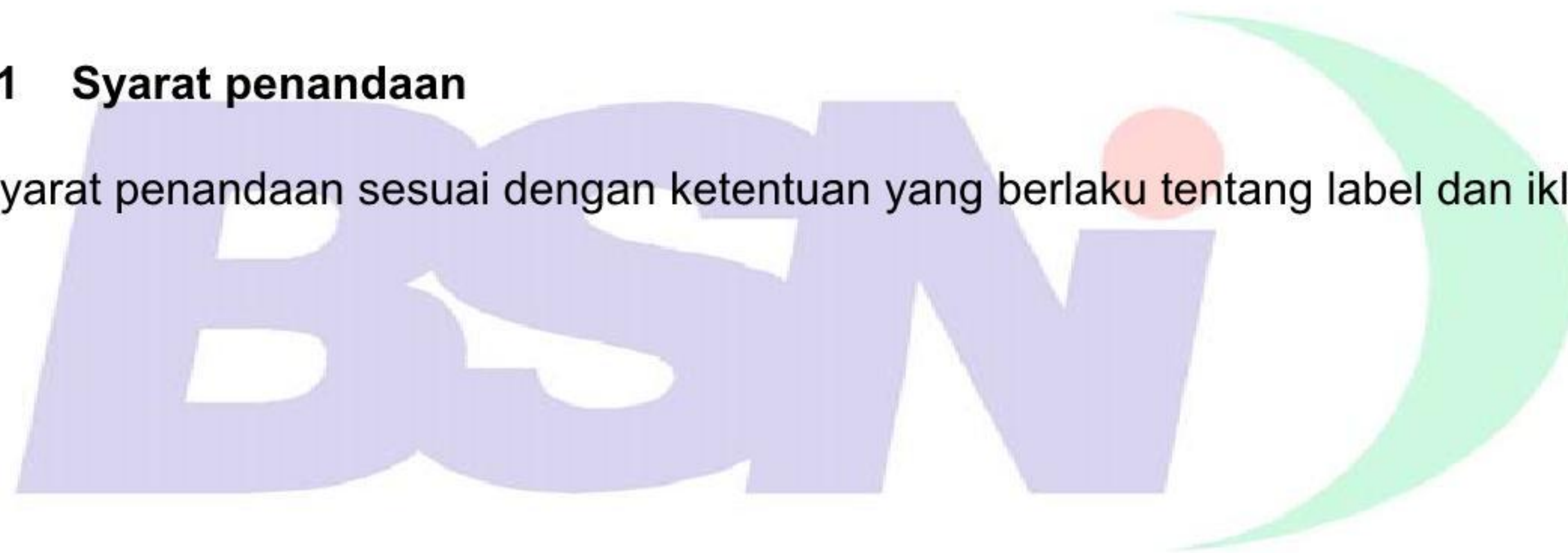
Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Produk dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan yang berlaku tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A
(normatif)
Cara uji bihun jagung

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan uji kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan uji kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan contoh bihun jagung dan ambil contoh secara aseptik sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan contoh bihun jagung dan ambil contoh secukupnya, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.1.3 Persiapan contoh untuk uji kimia

Buka kemasan contoh bihun jagung dan ambil contoh sebanyak 400 g, kemudian tempatkan dalam botol contoh yang bersih dan kering.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penciuman yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.1.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tercium bau khas bihun jagung, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika tercium selain bau khas bihun jagung, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.2.2 Warna

A.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera penglihatan yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.2.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati contoh uji untuk mengetahui warnanya; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika berwarna putih hingga putih kekuningan, maka hasil dinyatakan "putih hingga putih kekuningan"; dan
- b) jika terlihat selain warna putih hingga putih kekuningan, maka disebutkan warna yang diamati.

A.2.3 Rasa

A.2.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.2.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji secukupnya dan rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- b) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "normal"; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan "tidak normal".

A.3 Benda asing

A.3.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji diamati dengan indera penglihatan dan indera peraba yang dilakukan oleh panelis yang mempunyai kompetensi pengujian organoleptik.

A.3.2 Cara kerja

- a) Ambil contoh uji sebanyak 50 g dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- b) amati dan raba contoh uji tersebut untuk mengetahui apakah contoh uji mengandung benda lain selain bihun jagung misalnya tanah, pasir, batu-batuan, dan lain-lain; dan
- c) lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.3.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terlihat dan teraba benda asing, maka hasil dinyatakan "tidak ada"; dan
- b) jika terlihat dan teraba benda asing, maka disebutkan benda asing yang diamati dan hasil dinyatakan "ada".

A.4 Keutuhan

A.4.1 Prinsip

Bobot contoh utuh dibandingkan dengan bobot contoh total.

A.4.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.

A.4.3 Cara kerja

- a) Buka bungkus dan timbang bobot contoh keseluruhan (W);
- b) kemudian pisahkan contoh yang hancur dan timbang (W_1).

A.4.4 Perhitungan

$$\text{Keutuhan (\%)} = \left(\frac{W - W_1}{W} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

W adalah bobot contoh keseluruhan, dinyatakan dalam gram (g);
 W_1 adalah bobot contoh yang hancur, dinyatakan dalam gram (g).

A.5 Kadar air

A.5.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

A.5.2 Peralatan

- a) Oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) Desikator yang berisi desikan; dan
- d) Cawan bertutup.

A.5.3 Cara kerja

- a) Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- b) masukkan 2 g contoh ke dalam cawan, tutup, dan timbang (W_1);
- c) panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan disamping cawan di dalam oven pada suhu $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama 1 (satu) jam setelah suhu oven $(130 \pm 3) ^\circ\text{C}$;
- d) tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- e) lakukan pekerjaan duplo; dan
- f) hitung kadar air dalam contoh.

A.5.4 Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \left(\frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, dinyatakan dalam gram (g).

A.5.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 2% dari nilai rata-rata hasil kadar air. Jika kisaran lebih besar dari 2%, maka uji harus diulang kembali.

A.6 Abu

A.6.1 Prinsip

Abu dihitung berdasarkan bobot abu yang terbentuk selama pembakaran dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih.

A.6.2 Peralatan

- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Desikator yang berisi desikan; dan
- Cawan pengabuan.

A.6.3 Cara kerja

- Panaskan cawan dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ selama kurang lebih satu jam dan dinginkan dalam desikator sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang dengan neraca analitik (W_0);
- masukkan 3 g sampai dengan 5 g contoh ke dalam cawan dan timbang (W_1);
- tempatkan cawan yang berisi contoh tersebut dalam tanur pada suhu $(550 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai terbentuk abu berwarna putih dan diperoleh bobot tetap;
- pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan sehingga suhunya sama dengan suhu ruang kemudian timbang (W_2);
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung abu dalam contoh.

A.6.4 Perhitungan

$$\text{Abu (\%)} = \left(\frac{W_2 - W_0}{W_1 - W_0} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 adalah bobot cawan kosong, dinyatakan dalam gram (g);

W_1 adalah bobot cawan dan contoh sebelum diabukan, dinyatakan dalam gram (g);

W_2 adalah bobot cawan dan contoh setelah diabukan, dinyatakan dalam gram (g).

A.6.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5% dari nilai rata-rata hasil perhitungan abu. Jika kisaran lebih besar dari 5%, maka uji harus diulang kembali.

A.7 Cemaran logam

A.7.1 Kadmium (Cd) dan timbal (Pb)

A.7.1.1 Prinsip

Destruksi contoh dengan cara pengabuan kering pada suhu 450 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) dengan panjang gelombang maksimal 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb.

A.7.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Cd dan Pb) terkalibrasi (sebaiknya menggunakan SSA tungku grafit);
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 10 mL;
- Gelas piala 250 mL;
- Botol polipropilen;
- Cawan porselen/platina/kuarsa 50 mL sampai dengan 100 mL; dan
- Kertas saring tidak berabu dengan spesifikasi *particle retention liquid* 20 µm sampai dengan 25 µm.

A.7.1.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO₃ pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan asam nitrat, HNO₃ 0,1 N;
encerkan 7 mL HNO₃ pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 mL HCl pekat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 000 µg/mL Cd;
larutkan 1,000 g Cd dengan 7 mL HNO₃ pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Cd 1 000 µg/mL siap pakai.
- Larutan baku 200 µg/mL Cd;
pipet 10 mL larutan baku 1 000 µg/mL Cd ke dalam labu ukur 50 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 200 µg/mL Cd.

- g) Larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd;
pipet 10 mL larutan baku 200 $\mu\text{g/mL}$ Cd ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian dikocok. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- h) Larutan baku kerja Cd;
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,5 mL, 1 mL; 2 mL; 4 mL; 7 mL dan 9 mL larutan baku 20 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,2 $\mu\text{g/mL}$; 0,4 $\mu\text{g/mL}$; 0,8 $\mu\text{g/mL}$; 1,4 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,8 $\mu\text{g/mL}$ Cd.
- i) Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb;
larutkan 1,000 g Pb dengan 7 mL HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1000 $\mu\text{g/mL}$ siap pakai.
- j) Larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ Pb; dan
pipet 5,0 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Pb ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g/mL}$.
- k) Larutan baku kerja Pb.
pipet ke dalam labu ukur 100 mL masing-masing sebanyak 0 mL, 0,2 mL; 0,5 mL; 1 mL; 2 mL; 3 mL dan 4 mL larutan baku 50 $\mu\text{g/mL}$ kemudian tambahkan 5 mL larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 0,5 $\mu\text{g/mL}$; 1,0 $\mu\text{g/mL}$; 1,5 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,0 $\mu\text{g/mL}$ Pb.

A.7.1.4 Cara kerja

- a) Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) dengan teliti dalam cawan porselen/platina/kuarsa;
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas pemanas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji tidak berasap lagi;
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5)^\circ\text{C}$ sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 mL sampai dengan 3 mL;
- e) keringkan cawan di atas pemanas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu $(450 \pm 5)^\circ\text{C}$ kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 mL HCl 6 N, sambil dipanaskan di atas pemanas listrik atau penangas air sampai kering, kemudian larutkan dengan HNO_3 0,1 N dan masukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V), jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring, ke dalam botol polipropilen;
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal sekitar 228,8 nm untuk Cd dan 283,3 nm untuk Pb;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C); dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.7.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam, (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);

V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);

m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan logam. Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.7.2 Timah (Sn)

A.7.2.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan HNO_3 dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi $\text{N}_2\text{O-C}_2\text{H}_2$.

A.7.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) beserta kelengkapannya (lampu katoda Sn) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Penangas air;
- Labu ukur 1 000 mL, 100 mL dan 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 5 mL berskala 0,1 mL, terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 50 mL; dan
- Gelas piala 250 mL.

A.7.2.3 Pereaksi

- Larutan kalium klorida, 10 mg/mL K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 mL.
- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam klorida, HCl pekat;
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 mL HCl pekat dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 200 mL air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku kerja Sn.
pipet 10 mL HCl pekat dan 1,0 mL larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 mL. Tambahkan masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL dan 2,5 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$; 20 $\mu\text{g/mL}$ dan 25 $\mu\text{g/mL}$ Sn.

A.7.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g (m) dengan teliti ke dalam Erlenmeyer 250 mL, tambahkan 30 mL HNO₃ pekat dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 mL sampai dengan 6 mL atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat Erlenmeyer dari pemanas listrik, tambahkan 25 mL HCl pekat, dan panaskan selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 mL sampai dengan 15 mL;
- tambahkan 40 mL air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 mL, bilas Erlenmeyer tersebut dengan 10 mL air suling (V);
- tambahkan 1,0 mL KCl, dinginkan pada suhu ruang, tepatkan dengan air suling sampai tanda garis dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimal 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam (µg/mL) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.7.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan timah (Sn) (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi timah (Sn) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter (µg/mL)
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g).

A.7.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan timah (Sn). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.7.3 Merkuri (Hg)

A.7.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa merkuri dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) tanpa nyala pada panjang gelombang maksimal 253,7 nm.

A.7.3.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Pendingin terbuat dari borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* setinggi 100 mm, dan dilapisi dengan batu didih berdiameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- Tabung destruksi;
- Labu destruksi 250 mL berdasar bulat;
- Labu ukur 1000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi; dan
- Gelas piala 500 mL.

A.7.3.3 Pereaksi

- Larutan asam sulfat, H_2SO_4 9 M;
- Larutan asam nitrat, HNO_3 7 M;
- Campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan Natrium molibdat, $\text{NaMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2%;
- Larutan pereduksi;
campurkan 50 mL H_2SO_4 dengan 300 mL air suling dalam gelas piala 500 mL dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan Natrium borohidrida (NaBH_4);
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 mL.
- Larutan pengencer;
masukkan 300 mL sampai dengan 500 mL air suling kedalam labu ukur 1 000 mL dan tambahkan 58 mL HNO_3 kemudian tambahkan 67 mL H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- Larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 mL air suling dalam gelas piala 250 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ Hg;
pipet 1 mL larutan baku 1 000 $\mu\text{g/mL}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$.
- Larutan baku kerja Hg; dan
pipet masing-masing 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; dan 2 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/mL}$; 0,005 $\mu\text{g/mL}$; 0,01 $\mu\text{g/mL}$; dan 0,02 $\mu\text{g/mL}$ Hg.
- Batu didih.

A.7.3.4 Cara kerja

A.7.3.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 mL H_2SO_4 9 M, 20 mL HNO_3 7 M, 1 mL larutan natrium molibdat 2%, dan 5 butir sampai dengan 6 butir batu didih;
- hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas pemanas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- tambahkan 20 mL campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1) melalui pendingin;
- hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- tambahkan 10 mL air suling melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;
- didihkan lagi selama 10 menit;
- matikan pemanas listrik dan cuci pendingin dengan 15 mL air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu ruang;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- pipet 25 mL larutan di atas ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.7.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan merkuri (Hg), (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi merkuri (Hg) dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
 V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
 m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
 fp adalah faktor pengenceran.

A.7.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan merkuri (Hg). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.8 Cemarkan arsen (As)

A.8.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) pada panjang gelombang maksimal 193,7 nm.

A.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) yang dilengkapi dengan lampu katoda As dan generator uap hidrida (HVG) terkalibrasi;
- Tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C ;
- Microwave digester*;
- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Pemanas listrik;
- Burner* atau *bunsen*;
- Labu *Kjeldahl* 250 mL;
- Labu terbuat dari borosilikat berdasar bulat 50 mL;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL, terkalibrasi;
- Gelas ukur 25 mL;
- Pipet volumetrik 25 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur berskala 0,05 mL atau mikro buret terkalibrasi;
- Cawan porselen 50 mL; dan
- Gelas piala 200 mL.

A.8.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat;
- Asam perklorat, HClO_4 pekat;
- Ammonium oksalat, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- Hidrogen peroksida, H_2O_2 pekat;
- Larutan Natrium borohidrida, NaBH_4 ;
 larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 mL.

- g) Larutan Asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 mL HCl pekat kedalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) Larutan Timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam gelas piala 200 mL dan tambahkan 100 mL HCl pekat. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- i) Larutan Kalium iodida, KI 20%;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- j) Larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/mL;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 mL H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 mL HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 mL dengan air suling;
- k) Larutan baku 1000 $\mu\text{g/mL}$ As;
larutkan 1,3203 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- l) Larutan baku 100 $\mu\text{g/mL}$ As;
pipet 10 mL larutan baku As 1 000 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ As.
- m) Larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As; dan
pipet 1 mL larutan baku As 100 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/mL}$ As.
- n) Larutan baku kerja As;
pipet masing-masing 1,0 mL; 2,0 mL 3,0 mL; 4,0 mL dan 5,0 mL larutan baku 1 $\mu\text{g/mL}$ As ke dalam labu ukur 100 mL terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,05 $\mu\text{g/mL}$ As.

A.8.4 Cara kerja

A.8.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g sampai dengan 10 g contoh (m) kedalam labu *Kjeldahl* 250 mL, tambahkan 5 mL sampai dengan 10 mL HNO_3 pekat dan 4 mL sampai dengan 8 mL H_2SO_4 pekat dengan hati-hati;
- b) setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO_3 pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- c) tambahkan 2 mL HClO_4 70% sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangkan setelah penambahan HClO_4 , tambahkan lagi sedikit HNO_3 pekat);
- d) dinginkan, tambahkan 15 mL H_2O dan 5 mL $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ jenuh;
- e) panaskan sehingga timbul uap SO_3 di leher labu;
- f) dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 mL dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- g) pipet 25 mL larutan diatas dan tambahkan 2 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- h) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- i) tambahkan larutan pereduksi (NaBH_4) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- j) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;

- k) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- l) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- m) lakukan pengerjaan duplo; dan
- n) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.4.2 Destruksi menggunakan *microwave digester* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 mL HNO_3 , 1 mL H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 mL secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (V);
- d) pipet 10 mL larutan destruksi ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 mL, tambahkan 1 mL larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, uapkan di atas pemanas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur dengan suhu 450°C (± 1 jam);
- e) dinginkan, larutkan dengan 2,0 mL HCl 8 M, 0,1 mL KI 20% dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- f) siapkan NaBH_4 dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- g) tuangkan larutan baku kerja As 0,01 $\mu\text{g/mL}$; 0,02 $\mu\text{g/mL}$; 0,03 $\mu\text{g/mL}$; 0,04 $\mu\text{g/mL}$; 0,05 $\mu\text{g/mL}$ serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* atau *bunsen* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- h) baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi (C);
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.8.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (As), (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times fp$$

Keterangan:

- C adalah konsentrasi arsen dari kurva kalibrasi, dinyatakan dalam mikrogram per mililiter ($\mu\text{g/mL}$);
- V adalah volume larutan akhir, dinyatakan dalam mililiter (mL);
- m adalah bobot contoh, dinyatakan dalam gram (g);
- fp adalah faktor pengenceran.

A.8.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 16% dari nilai rata-rata hasil kandungan arsen (As). Jika kisaran lebih besar dari 16%, maka uji harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan mikroba

A.9.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*

A.9.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.9.1.2 Peralatan

- Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 10 000 rpm sampai dengan 12 000 rpm;
- Otoklaf;
- Pemanas listrik;
- Neraca kapasitas 2000 g terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- Labu ukur 1 000 mL, 500 mL, 100 mL, dan 50 mL terkalibrasi;
- Gelas piala steril;
- Labu erlenmeyer steril;
- Botol pengencer steril;
- Pipet volumetrik steril 10,0 mL dan 1,0 mL terkalibrasi dilengkapi dengan *bulb* dan *pipettor*;
- Tabung reaksi; dan
- Sendok, gunting, dan spatula steril.

A.9.1.3 Larutan pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- | | |
|----------------------------|--------|
| - KH_2PO_4 | 34 g |
| - Air suling | 500 mL |

Atur pH dengan NaOH sehingga mencapai pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 mL dengan air suling. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, simpan pada refrigerator. Untuk membuat larutan pengencer 1,25 mL larutan stok diencerkan dengan air suling sampai volume 1 000 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol pengencer sebanyak 450 mL dan tabung reaksi sebanyak 9 mL kemudian disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.9.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pengencer steril sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.9.2 Angka lempeng total (35 °C, 48 jam)

A.9.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.

A.9.2.2 Peralatan

- Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air bersirkulasi (45 ± 1) °C;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Botol pengencer 160 mL terbuat dari gelas borosilikat, dengan sumbat karet atau tutup ulir plastik;
- Pipet ukur 1 mL steril dengan skala 0,1 mL dilengkapi *bulb* dan *pipettor*; dan
- Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm).

A.9.2.3 Pembenihan dan pengencer

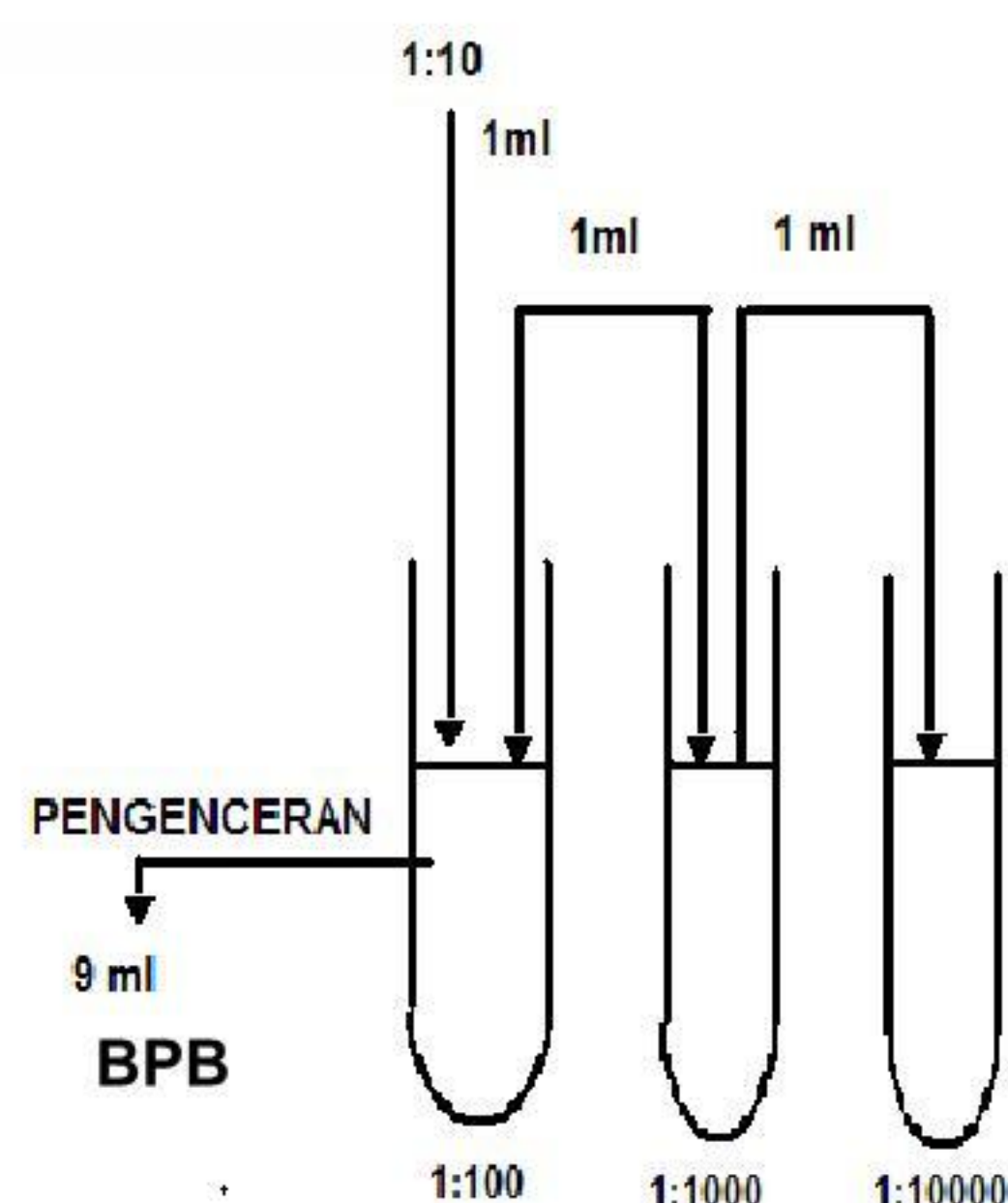
Plate count agar (PCA)

- | | |
|-----------------|----------|
| – Tryptone | 5 g |
| – Yeast extract | 2,5 g |
| – Glukosa | 1 g |
| – Agar | 15 g |
| – Air suling | 1 000 mL |

Larutkan bahan-bahan diatas menjadi 1 000 mL dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol pengencer. Sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit.

A.9.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar A.1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);



Gambar A.1 - Tingkat pengenceran menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB)

- pipet masing-masing 1 mL dari tingkat pengenceran (F) 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 mL sampai dengan 15 mL media PCA yang masih cair dengan suhu (45 ± 1) °C ke dalam masing-masing cawan petri;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;

- e) kerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- f) biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- g) masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam; dan
- h) catat pertumbuhan koloni (n) pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.9.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.9.2.6 Pernyataan hasil

A.9.2.6.1 Cara menghitung

- a) Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- b) jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

Keterangan:

- C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;
- n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;
- n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;
- d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1\,000 \times 640 = 640.000 \text{ (} 6,4 \times 10^5 \text{)}$

- jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2 contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7 150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 \text{ (} 6,5 \times 10^6 \text{)}$
~	6 490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 \text{ (} 5,9 \times 10^6 \text{)}$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni yang merambat.

Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :

- perambatan berupa rantai yang tidak terpisah;
- perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
- perambatan yang terjadi pada pinggir atau permukaan pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk lebih dari satu perambatan terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka tiap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.9.2.6.2 Cara membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- a) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut
- bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil; dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya : 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.9.3 *Escherichia coli*

A.9.3.1 Prinsip

Pertumbuhan *Escherichia coli* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung *Durham*, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.9.3.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, ($45,5 \pm 0,2$) °C;

- c) Rak untuk tabung reaksi;
- d) Pipet ukur 10 mL steril dan 1 mL berskala 1 mL;
- e) Botol pengencer terbuat dari gelas borosilikat, dengan tutup ulir plastik;
- f) Tabung reaksi
- g) Tabung *Durham*;
- h) Cawan petri gelas/plastik steril (ukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm); dan
- i) Jarum Ose, dengan diameter dalam kira-kira 3 mm.

A.9.3.3 Pembenihan pengencer dan pereaksi

- a) *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth / *Lauryl tryptose* (LT) broth;
- b) *Brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2%;
- c) *Escherichia coli* (EC) broth;
- d) Agar *Levine's eosin methylene blue* (L-EMB);
- e) *Plate count agar* (PCA);
- f) *Gram stain*;
- g) *Tryptone (tryptophane) broth*;
- h) Pereaksi Kovacs';
- i) *Methyl red – Voges Proskauer* (MR – VP) broth;
- j) Pereaksi *Voges Proskauer*;
- k) Larutan merah metil;
- l) *Koser's citrate broth*;
- m) *Peptone diluents* 0,1%;
- n) Pereaksi indol;
- o) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- p) *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);
- q) Larutan *alfa naftol* 5%; dan
- r) Kristal kreatin.

A.9.3.4 Cara kerja

B.9.3.4.1 APM – Uji pendugaan untuk *Escherichia coli*

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate tryptose* (LST) broth yang didalamnya terdapat tabung *Durham* terbalik. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;
- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35°C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (24 ± 2) . Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam, dan nyatakan tabung tersebut "positif"; dan
- g) lakukan uji penegasan terhadap semua tabung yang positif dalam uji pendugaan.

B.9.3.4.2 APM – Uji penegasan untuk *Escherichia coli*

- a) Pindahkan satu Ose dari setiap tabung LST broth yang positif ke dalam tabung EC broth yang berlainan,

- b) inkubasikan tabung-tabung EC *broth* tersebut ke dalam penangas air yang bersirkulasi, selama (24 ± 2) jam pada suhu $(45,5 \pm 0,2)$ °C, tabung yang telah terbentuk gas dinyatakan "positif",
- c) apabila negatif, inkubasikan dan periksa kembali pada jam ke- (48 ± 2) . Jika telah terbentuk gas maka tabung tersebut dinyatakan "positif", dan
- d) lakukan uji lengkap terhadap semua tabung yang positif untuk uji penegasan.

B.9.3.4.3 APM – Uji lengkap untuk *Escherichia coli*

- a) Kocok tabung-tabung EC *broth* yang positif secara hati-hati,
- b) ambil koloni sebesar satu mata Ose, kemudian digoreskan/ditanamkan pada satu cawan agar L-EMB, sedemikian rupa hingga dihasilkan koloni yang terpisah-pisah dengan jarak minimal 0,5 cm,
- c) inkubasikan cawan agar L-EMB tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C,
- d) periksa cawan-cawan terhadap adanya koloni yang berwarna gelap dengan atau tanpa kilat logam,
- e) dari tiap cawan agar L-EMB, pindahkan maksimal 5 koloni yang diduga *E. coli* pada tabung agar miring PCA,
- f) inkubasikan tabung-tabung agar miring tersebut selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 35 °C dan gunakan untuk uji selanjutnya,
- g) buatlah pewarnaan Gram dari tiap biakan. *E. coli* adalah gram negatif dan berbentuk batang tak berspora yang harus diuji menggunakan reaksi-reaksi IMVIC seperti dibawah ini serta harus diinokulasikan kembali ke tabung LST *broth* untuk menegaskan adanya produksi gas,
 - uji indol
 - Inokulasi tabung *tryptophane broth*,
 - inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C,
 - uji terbentuknya indol dilakukan dengan menambahkan 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL pereaksi Kovacs', dan
 - uji indol adalah positif bila terbentuk warna merah pada lapisan atas.
 - uji *Voges Proskauer*
 - Inokulasi tabung medium MR-VP *broth* dari setiap tabung PCA dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C,
 - pindahkan 1 mL biakan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril,
 - tambahkan 0,6 mL larutan *alfa naftol* 5% dalam alkohol dan 0,2 mL larutan KOH 40% serta beberapa butir kristal kreatin, dan
 - uji *Voges Proskauer* adalah positif bila terbentuk warna eosin merah muda dalam waktu 2 jam.
 - uji merah metil
 - Setelah uji *Voges Proskauer*, inkubasikan kembali tabung MR-VP *broth* selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
 - tambahkan 5 tetes indikator merah metil pada setiap tabung, dan
 - uji merah metil adalah positif bila terbentuk warna merah dan negatif bila terbentuk warna kuning.
 - uji sitrat
 - Inokulasi tabung *Koser's citrate broth* dengan menggunakan jarum lurus sedemikian rupa sehingga hanya mengenai permukaan media. Terlalu banyak inokulasi dapat menyebabkan terbawanya zat-zat lain,
 - inkubasikan selama 96 jam pada suhu 35 °C, dan
 - uji sitrat adalah positif bila terbentuk kekeruhan yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dalam tabung.
 - Uji pembentukan gas dari *Lactose*

- Inokulasikan tabung LST dari setiap agar miring PCA. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , dan
- periksa tabung tabung itu terhadap adanya pembentukan gas.

B.9.3.4.4 Klasifikasi dan laporan

Tabel A.1 - Reaksi biokimia *E. coli* pada uji IMVIC

<i>Escherichia coli</i>	Indol	Merah metil	Voges Proskaeur	Sitrat
Varitas I	+	+	-	-
Varitas II	-	+	-	-

- a) Klasifikasikan sebagai *E. coli* apabila :
- uji IMVIC mengikuti pola ++-- atau -+-- sesuai dengan Tabel A.1,
 - pewarnaan gram menunjukkan gram negatif bentuk batang tidak berspora; dan
 - terbentuknya gas dalam LST *broth* dengan waktu inkubasi (48 ± 2) jam pada suhu 35°C
- b) Hitunglah APM *E. coli* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung
- tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *E. coli*.

Tabel A.2 – APM/g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1 g/mL; 0,01 g/mL; dan 0,001 g/mL contoh

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	1	2	27	3	3	3	>1 100

A.9.4 *Staphylococcus aureus*

A.9.4.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam media khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulasi.

A.9.4.2 Peralatan

- a) Inkubator (35 ± 1) °C, terkalibrasi;
- b) Oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi;
- c) *Spreader* steril dari gelas;
- d) Botol pengencer 500 mL;
- e) Pipet ukur 10 mL dan 1 mL;
- f) Tabung reaksi;
- g) Cawan petri gelas/plastik steril (berukuran minimal 15 mm x 90 mm);
- h) Jarum Ose.

A.9.4.3 Pembenihan dan pereaksi

- a) *Baird-parker agar* (BPA);
- b) *Brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- c) Plasma koagulase kelinci.

A.9.4.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai dengan A.9.1;
- b) pipet 1 mL larutan contoh ke dalam 3 cawan petri berisi media BPA berbeda (misalkan 1 mL dibagi menjadi 0,3 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL larutan contoh);
- c) sebarkan contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh diserap oleh medium (± 10 menit). Jika contoh tidak mudah terserap oleh media, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri dibalik;
- d) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung koloni yang diduga sebagai *Staphylococcus aureus*, yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum Ose.

A.9.4.5 Uji koagulasi

- a) Pindahkan 5 sampai dengan 10 koloni yang diduga *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung berisi 0,2 mL sampai dengan 0,3 mL BHIB;
- b) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- c) tambahkan plasma koagulase kelinci sebanyak 0,5 mL ke dalam biakan BHIB dan campur;
- d) inkubasikan campuran plasma koagulase kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam kemudian amati terbentuknya penggumpalan, setiap 6 jam. *Staphylococcus aureus* adalah positif apabila terbentuk gumpalan yang kokoh dan utuh serta dapat bertahan dalam tabung ketika dibalikkan;
- e) amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi, lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- f) ratakan koloni (n) dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencernya; dan

- g) hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g contoh.

A.9.4.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) = $n \times F$

Keterangan:

n adalah jumlah koloni, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.9.5 *Bacillus cereus*

A.9.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* ditandai dengan terbentuknya koloni eosin merah muda penghasil *lechinase*, yang diikuti dengan uji penegasan pada berbagai media.

A.9.5.2 Peralatan

- Inkubator (30 ± 2 °C dan 35 ± 2 °C, terkalibrasi;
- Alat homogenisasi yang sesuai dengan kecepatan putaran 18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm;
- Penangas air, (48 – 50) °C;
- Mikroskop, *microscop slide* dan *cover slip*;
- Alat penghitung koloni;
- Vorteks mixer*;
- Bunsen* besar dan kecil;
- Rak tabung biakan;
- Botol, steril;
- Tabung anaerobik *GasPak* dilengkapi dengan $H_2 + CO_2$ generator envelopes dan katalisnya;
- Tabung biakan, (ukuran 13 mm x 100 mm), steril;
- Pipet ukur 10 mL, 5 mL dan 1 mL berskala 0,1 mL steril;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril;
- Batang penyebar steril, diameter 3 mm sampai dengan 4 mm dengan area penyebar 45 mm sampai dengan 55 mm;
- Jarum Ose, berukuran 2 mm dan 3 mm; dan
- Pena penanda.

A.9.5.3 Media dan pereaksi

- Agar *Mannitol-egg yolk-polymyxin* (MYP);
- Egg yolk emulsion*, 50%;
- Trypticase soy-polymyxin broth*;
- Larutan polimiksin B untuk *MYP agar* (0,1%) dan *trypticase soy-polymyxin broth* (0,15%);
- Lisozim 0,001%;
- Phenol red glucose broth*;
- Agar tirosin;
- Lysozyme broth*;
- Media *Voges-Proskauer*;
- Nutrient broth*;
- Nitrate broth*;
- Nutrient agar* (NA) untuk *B. cereus*;
- Pereaksi *sulfanilic acid*;
- Pereaksi alfa naftol;

- o) *Butterfield's phosphate-buffered dilution water* (BPB) yang disterilkan dalam botol dengan volume akhir (450 ± 5) mL dan (90 ± 2) mL;
- p) Pereaksi uji *Voges-Proskauer*;
- q) Larutan kalium hidroksida, KOH 40%;
- r) Kristal kreatin; dan
- s) Metanol.

A.9.5.4 Persiapan contoh

- a) timbang 50 g contoh ke dalam blender yang bersih dan steril secara aseptik,. Tambahkan 450 mL *butterfield's phosphate-buffered dilution water* (1:10) dan kocok selama 2 menit pada kecepatan tinggi (18 000 rpm sampai dengan 21 000 rpm); dan
- b) buat seri pengenceran dengan menggunakan larutan BPB (1:10).

A.9.5.5 Penetapan *B. cereus*

A.9.5.5.1 APM - *B. cereus*

- a) Teknik APM direkomendasikan untuk menghitung *B.cereus* dalam contoh yang diharapkan mengandung *B. cereus* lebih kecil dari 10 per gram contoh;
- b) inokulasikan masing-masing 1 mL larutan dari setiap tingkat pengenceran (larutan 10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *trypticase soy-polymyxin broth*;
- c) inkubasikan tabung-tabung tersebut dalam inkubator pada suhu 30°C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke- (48 ± 2) untuk melihat pertumbuhan bakteri *B. cereus*;
- e) gores biakan dari tabung yang positif dengan Ose ke dalam media agar MYP dan inkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam pada suhu 30°C ;
- f) ambil 1 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lecithinase* positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.9.5.6; dan
- g) hitunglah APM *B. cereus* dengan menggunakan Tabel A.2 APM berdasarkan jumlah tabung-tabung dari 3 seri pengenceran yang telah dipastikan mengandung *B. cereus*.

A.9.5.5.2 Angka Lempeng Total - *B. cereus*

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan memindahkan 10 mL contoh yang telah dihomogenkan ke dalam 90 mL larutan pengencer, aduk dengan kuat dan lanjutkan ke pengenceran 10^{-6} ;
- b) inokulasi sebanyak 0,1 mL masing-masing tingkat pengenceran (termasuk 1:10) menggunakan batang penyebar steril di atas permukaan media agar MYP, lakukan secara duplo;
- c) inkubasi media agar MYP pada suhu 30°C selama 24 jam;
- d) amati koloni yang dikelilingi oleh zona endapan yang menunjukkan bahwa *B. cereus* menghasilkan *lecithinase* berwarna merah muda. Warnanya akan menjadi lebih jelas apabila inkubasi dilanjutkan;
- e) jika warna merah muda tidak jelas, lanjutkan inkubasi selama 24 jam lagi sebelum perhitungan koloni;
- f) pilih media yang mengandung 15 koloni sampai dengan 150 koloni eosin merah muda penghasil *lecithinase*;
- g) beri tanda di bagian dasar cawan petri berdasarkan zona yang terbentuk menggunakan pena penanda untuk memudahkan perhitungan dan penjumlahan koloni *B. cereus*;
- h) ambil 5 atau lebih koloni yang positif mengandung *B. cereus* dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus* sesuai dengan A.9.5.6; dan

- i) hitung jumlah *B.cereus* per gram contoh berdasarkan persentase koloni yang telah diuji dan ditegaskan sebagai *B. cereus*.

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F \times 10$$

Keterangan:

- n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, dinyatakan dalam koloni per gram (koloni/g);
 a adalah jumlah koloni yang sudah ditegaskan sebagai *B.cereus*;
 b adalah jumlah koloni yang diambil dari koloni yang positif *B.cereus*;
 F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai;
 10 adalah faktor pengenceran dari jumlah contoh yang diinokulasi (0,1 mL).

Contoh perhitungan:

Jika jumlah rata-rata yang diperoleh pada pengenceran 10^{-3} adalah 65 dan 4 dari 5 koloni telah diuji dan dinyatakan sebagai *B. cereus* maka jumlah sel *B.cereus* per gram contoh adalah :

$$B. cereus \text{ (koloni/g)} = 65 \times \frac{4}{5} \times 1.000 \times 10 \\ = 520.000$$

A.9.5.6 Uji penegasan untuk *B. cereus*

A.9.5.6.1 Biakan campuran

- Ambil 5 atau lebih koloni yang berwarna eosin merah muda dengan *lechitinase* positif dari media agar MYP dan pindahkan ke media miring NA untuk uji penegasan *B.cereus*;
- inkubasi selama 24 jam pada suhu 30 °C;
- lakukan pengamatan secara mikroskopis, disertai pewarnaan gram. *B. cereus* akan tampak berbentuk batang besar, gram positif, dengan rantai pendek hingga panjang, spora berbentuk ellips, letaknya ditengah sampai sub terminal dan spora tersebut tidak menggembungkan sporangium;
- pindahkan biakan dengan ose 3 mm dari setiap media miring NA ke tabung (13 x 100) mm yang mengandung 0,5 mL BPB kemudian dikocok dengan *vorteks*, untuk mensuspensikan biakan; dan
- suspensi biakan ini digunakan untuk uji penegasan *B. cereus* berikut:

A.9.5.6.2 Uji *phenol red glucose broth*

- Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 2 mm ke dalam 3 mL *phenol red glucose broth* dalam tabung;
- inkubasi tabung tersebut secara anaerobik selama 24 jam pada suhu 35 °C dalam tabung anaerobik GasPak; dan
- kocok tabung tersebut dengan kuat dan amati pertumbuhan *B.cereus* yang ditandai oleh peningkatan kekeruhan dan perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan bahwa asam telah dihasilkan secara anaerobik dari glukosa. Perubahan warna dari merah ke orange/kuning bisa terjadi pada sebagian tabung kontrol yang tidak diinokulasi. Hal ini disebabkan oleh terjadinya pengurangan pH akibat pemaparan media oleh CO₂ yang terbentuk dalam tabung anaerobik GasPak. Gunakan kontrol positif dan kontrol negatif untuk menyakinkan perbedaan antara reaksi positif dan positif palsu.

A.9.5.6.3 Uji nitrate broth

- Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 3 mm ke dalam 5 mL *nitrate broth* dalam tabung;
- inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- untuk uji nitrit, tambahkan 0,25 mL masing-masing pereaksi *sulfanilic acid* dan pereaksi *alfa naftol* ke dalam setiap tabung; dan
- warna oranye yang terbentuk dalam 10 menit menunjukkan bahwa nitrat telah direduksi menjadi nitrit.

A.9.5.6.4 Uji media modified VP

- Inokulasikan suspensi biakan dengan menggunakan Ose 3 mm ke dalam 5 mL media VP dalam tabung;
- inkubasi tabung tersebut selama (48 ± 2) jam pada suhu 35 °C;
- untuk uji terbentuknya *acetylmethyl-carbinol*, pipet 1 mL biakan ke dalam tabung uji (16 x 125) mm, tambahkan 0,6 mL larutan *alfa naftol*, dan 0,2 mL KOH 40%;
- aduk dan tambahkan sedikit kristal kreatin;
- amati setelah didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang; dan
- uji positif apabila terbentuk warna merah muda atau violet.

A.9.5.6.5 Uji agar tirosin

- Inokulasikan suspensi biakan dengan ose 3 mm ke seluruh permukaan media miring agar tirosin;
- inkubasi media miring tersebut selama 48 jam pada suhu 35 °C;
- amati zona bening sekitar pertumbuhan bakteri yang terbentuk yang menunjukkan bahwa tirosin telah terdekomposisi; dan
- jika hasil uji adalah negatif maka inkubasi dilanjutkan sampai total selama 7 hari sebelum hasil dinyatakan negatif.

A.9.5.6.6 Uji lysozyme broth

- Inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* yang mengandung lisozim 0,001% dalam tabung;
- inokulasikan juga suspensi biakan ke dalam 2,5 mL *nutrient broth* sebagai kontrol positif;
- inkubasi tabung tersebut selama 24 jam pada suhu 35 °C;
- uji amati pertumbuhan dalam *lysozyme broth* dan dalam kontrol *nutrient broth*; dan
- inkubasi tabung yang negatif selama 24 jam lagi sebelum dibuang.

A.9.5.6.7 Uji agar MYP

- Uji ini tidak diperlukan apabila hasil uji telah jelas dengan menggunakan media agar MYP dan tidak ada gangguan dari mikroorganisme yang lain;
- bagi bagian dasar cawan petri menjadi 6 bagian sampai dengan 8 bagian yang sama menggunakan pena penanda;
- inokulasikan suspensi biakan dengan Ose 2 mm disetiap bagian agar MYP tersebut dengan cara menyentuh permukaan agar MYP secara hati-hati. Dalam satu cawan petri dapat diuji 6 atau lebih biakan;
- biarkan inokulum diserap sempurna sebelum diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C;
- amati terbentuknya *lecithinase* yang ditunjukkan oleh zona presipitasi disekitar pertumbuhan;
- manitol tidak difermentasi oleh isolat jika media tempat tumbuh dan sekitarnya berwarna eosin merah muda. Warna kuning menunjukkan bahwa asam terbentuk dari manitol; dan

g) koloni *B. cereus* biasanya positif *lecithinase* dan negatif mannitol pada agar MYP.

A.9.5.6.8 Hasil uji penegasan *B. cereus*

Hasil uji penegasan menunjukkan sebagai *B. cereus* apabila:

- Menghasilkan gram positif dengan spora yang tidak sebesar sporangium;
- menghasilkan *lecithinase* dan tidak memfermentasikan manitol dalam media agar MYP; tumbuh dan menghasilkan asam dari glukosa secara anaerobik;
- mereduksi nitrat menjadi nitrit;
- menghasilkan *acetylmethylcarbinol*;
- menguraikan L-tirosin; dan
- tumbuh dalam media yang mengandung lisozim 0,001%.

A.9.6 Kapang

A.9.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang dalam media yang sesuai setelah diinkubasi pada suhu $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.9.6.2 Peralatan

- Inkubator $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, terkalibrasi;
- Otoklaf;
- Penangas air $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- pH meter;
- Alat penghitung koloni;
- Tally register*;
- Pipet ukur 10 mL dan 1 mL, steril;
- Cawan petri gelas/plastik (berukuran minimal 15 mm x 90 mm), steril; dan
- Bent glass rod*.

A.9.6.3 Pembenihan, pengencer dan pereaksi

- Agar *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC);
- Agar *dichloran 18% glycerol* (DG 18);
- Larutan pepton 0,1%
 - pepton 1 g
 - Air suling 1000 mL

Larutkan pepton dalam air suling kemudian sterilkan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121°C dan atur pH sehingga mencapai pH akhir $(7,0 \pm 0,2)$.

- Larutan antibiotik:

Antibiotik ditambahkan di media kapang untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

A.9.6.4 Persiapan dan Homogenisasi Contoh

- Timbang 50 g contoh secara aseptik ke dalam botol pengencer yang telah berisi 450 mL larutan pepton 0,1% steril sehingga diperoleh pengenceran 1 : 10; dan
- Kocok campuran beberapa kali hingga homogen

A.9.6.5 Cara kerja

- a) Buat tingkat pengenceran dari 10^{-2} sampai dengan 10^{-6} dengan menggunakan larutan pepton 0,1%
- b) persiapan media dalam cawan dapat dilakukan dengan salah satu metode di bawah ini, yaitu :
 - metode sebar (media DRBC atau DG 18), penggunaan media DG 18 lebih sesuai untuk contoh uji yang mempunyai aw kurang dari 0,95: pipet 0,1 mL masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebar merata dengan menggunakan *bent glass rod*.
 - metode tuang (media DG 18):
 - pipet 1,0 mL masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri dan sesegera mungkin tuangkan 20 mL sampai dengan 25 mL media;
 - campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam selama 1 menit sampai dengan 2 menit; dan
 - biarkan hingga campuran dalam cawan petri memadat.
- c) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25°C selama 5 hari. Jangan menumpuk cawan lebih dari 3 tumpukan. Biarkan cawan dan jangan merubah posisinya;
- d) hitung koloni pada cawan setelah 5 hari inkubasi. Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu selama 48 jam. Jangan menghitung koloni dalam cawan sampai batas waktu inkubasi berakhir, karena merubah posisi cawan dapat mengakibatkan pertumbuhan sekunder spora; dan
- e) nyatakan hasil perhitungan sebagai koloni per gram contoh.

A.9.6.6 Pernyataan hasil

A.9.6.6.1 Cara menghitung

Hitung koloni kapang sesuai dengan A.9.2.6.1 untuk cawan yang berisi 10 koloni sampai dengan 150 koloni.

A.9.6.6.2 Cara membulatkan angka

Cara membulatkan angka pada hasil perhitungan kapang sesuai dengan A.9.2.6.2.

Bibliografi

- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 925.11, Ash of Macaroni Products*, 18th Edition, Chapter 32.5.03.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 926.07, Solids (Total) and Moisture in Macaroni Products, Air Oven Method*. 18th Edition, Chapter 32.5.02.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 971.21, Mercuri in Foods, Flameless Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.22.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 985.61, Tin in Canned Foods, Atomic Absorption Spectrophotometric Method*, 18th Edition, Chapter 9.2.35.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods: Atomic Absorption Spectrophotometry after Dry Ashing*, 18th Edition, Chapter 9.1.09.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. *AOAC Official Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method*, 18th Edition, Chapter 9.1.01.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Aerobic Plate Count*. Chapter 3.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Bacillus cereus*. Chapter 14.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Mold, Yeast and Mycotoxin*. Chapter 18.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2001. *Staphylococcus aureus*. Chapter 12.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2002. *Enumeration of Escherichia coli and The Coliform Bacteria*. Chapter 4.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 2003. *Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate*. Chapter 1.











BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id